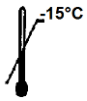
IMMUCOR

VWF & Propeptide Assay

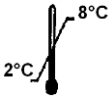
REF VP

IVD

CE



Boîte A (303296)



Boîte B (303297)

TABLE DES MATIÉRES

UTILISATIONS PRÉVUES **2**
RÉSUMÉ ET EXPLICATION **2**
PRINCIPES **2**
COMPOSITION DU COFFRET **2**
PRÉCAUTIONS **3**
MISES EN GARDE **4**
ÉCHANTILLONS **4**
Prélèvement et préparation des échantillons 4
Conservation des échantillons 4
MODE OPÉRATOIRE **4**
Matériel fourni 4
Matériel supplémentaire nécessaire 5
Procédure 5
DÉTAILS D'ÉTALONNAGE **8**
CONTRÔLE QUALITÉ **8**
INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS DU TEST **8**
LIMITES DE LA TECHNIQUE **8**
VALEURS ATTENDUES **9**
SEUIL DE COUPURE CLINIQUE **9**
PERFORMANCES SPÉCIFIQUES **9**
Précision 9
Limite de détection et intervalle de dosage 10
Comparaison des méthodes : comparaison du dosage VWF & Propeptide Assay au dosage ASSERACHROM VWF:Ag de Diagnostica Stago 10
Substances Interférente 10
RÉFÉRENCES **11**

UTILISATIONS PRÉVUES

Le dosage VWF & Propeptide Assay est un dosage immunoenzymatique (ELISA) en phase solide quantitatif utilisé pour la mesure du facteur von Willebrand Factor (VWF) et de son propeptide dans le plasma et pour le calcul du rapport propeptide:VWF. Un rapport propeptide:VWF élevé chez les patients VWF de type 1 indique une demi-vie réduite du VWF en circulation.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Le facteur Von Willebrand (VWF) est une protéine multimérique de poids moléculaire élevé présente dans le plasma qui joue un rôle crucial dans le recrutement et l'activation des plaquettes au niveau des lésions vasculaires. Par ailleurs, le VWF sert de protéine de transport au facteur de coagulation (facteur VIII), protégeant le facteur VIII d'une dégradation.[1,2]

La maladie de von Willebrand (VWD) est causée par une carence en VWF. La VWD de type 1 correspond à une carence quantitative caractérisée par la détection de taux réduits de VWF fonctionnel dans le plasma. La VWD de type 2 correspond à une carence qualitative caractérisée par la détection de taux normaux ou réduits de VWF fonctionnellement déficient dans le plasma. La VWD de type 3 correspond à une carence de VWF quantitative complète dans le plasma < 1 UI/dl. Le syndrome de von Willebrand acquis (AVWS) est un trouble sanguin rare associé à des affections lympho- et myéloprolifératives, des tumeurs solides, et des troubles immunologiques et cardiovasculaires.[3] L'AVWS est similaire à la VWD au niveau des analyses de laboratoire et des manifestations cliniques. Le diagnostic et le sous-typage de la VWD et de l'AVWS sont basés sur plusieurs résultats d'analyse, tels que l'activité du facteur VIII, les taux de VWF antigène, l'activité VWF, l'analyse multimérique de VWF, de même que les antécédents d'hémorragie du patient.[3,4]

Le propeptide du VWF est synthétisé dans le cadre d'une protéine pro-VWF, puis coupé, stocké et sécrété selon un rapport équimolaire avec le VWF mature.[5,6] Le taux de propeptide VWF dans la circulation peut servir de marqueur de la synthèse de VWF.[7] Chez les personnes présentant une faible synthèse de VWF, le taux de propeptide est diminué de manière similaire, donnant un rapport propeptide:VWF proche de 1.0. Chez les personnes présentant des taux normaux de synthèse de VWF et une survie diminuée du VWF en circulation, un rapport propeptide:VWF supérieur est observé.[7] La carence quantitative observée dans le VWD de type 1 peut être causée par une synthèse et un stockage inefficaces ou par une diminution de la demi-vie du VWF dans la circulation. À ce jour, plusieurs mutations ponctuelles dans le VWF ont montré qu'elles causaient une diminution de la demi-vie du VWF.[7,8] Sur le plan clinique, il est important de reconnaître ce phénotype à clairance augmentée dans la mesure où la clairance augmentée du VWF peut réduire l'efficacité du traitement par la desmopressine chez ces patients.[7,9,10] Le rapport propeptide:VWF est également utilisé dans le diagnostic de l'AVWS dans la mesure où le taux de propeptide est généralement normal ou supérieur et où le taux de VWF est réduit, causant un rapport propeptide:VWF supérieur.[11,12] En outre, les taux de propeptide et le rapport propeptide:VWF dans le plasma peuvent servir à évaluer l'étendue de l'activation des cellules endothéliales.[13]

PRINCIPES

Des étalons, contrôles et échantillons de plasma dilués sont ajoutés aux micropuits dans lesquels des anticorps monoclonaux spécifiques du VWF ou du propeptide ont été immobilisés. L'incubation des étalons et des échantillons dans les micropuits permet la liaison du VWF ou du propeptide aux anticorps immobilisés. Une étape de lavage élimine toutes les protéines de plasma non liées des micropuits. Les micropuits sont ensuite incubés avec un anticorps monoclonal biotinylé spécifique du VWF ou du propeptide qui a été capturé dans les puits. Une étape de lavage élimine ensuite tous les anticorps non liés. Ensuite, les micropuits sont incubés avec de la peroxydase de raifort marquée à la streptavidine. Suite à une étape de lavage qui élimine toute peroxydase de raifort marquée à la streptavidine non liée du micropuits, un substrat fluorescent est ajouté et incubé. Après incubation, la réaction est arrêtée en ajoutant une solution d'arrêt. La fluorescence est mesurée dans un lecteur de plaque fluorescente, avec une longueur d'onde d'excitation comprise entre 315 et 340 nm et une longueur d'onde d'émission comprise entre 370 et 470 nm. Les valeurs moyennes des étalons permettent de tracer une courbe d'étalonnage. Les valeurs moyennes pour les contrôles positifs et les échantillons patient sont déterminées à partir de cette courbe standard. Les résultats sont exprimés en UI/dl pour le VWF et en U/dl pour le propeptide.

Cette trousse contient deux contrôles positifs. Les contrôles positifs permettent de confirmer que les étalons ont été correctement dilués et que les échantillons avec des taux d'antigène provenant de régions différentes de la courbe d'étalonnage indiquent un recouvrement correct. Les valeurs escomptées pour les deux contrôles sont spécifiques des lots et se trouvent dans l' Analysis Software. Les valeurs de contrôle situées en dehors des intervalles acceptables indiquent un dosage non valide.

COMPOSITION DU COFFRET

Nombre maximal de tests par coffret:

- **VWF&P: 41 en double**

Tous les réactifs devront être stockés comme indiqué sur l'étiquette.

	REF	
MSVW MSPRP	403569 403567	Micropuits : barrettes de micropuits noirs à fond plat revêtus d'anticorps spécifiques du VWF (code-couleur jaune) ou du propeptide (code couleur vert). Contiennent du matériel d'origine murine et bovine. Prêt à l'emploi. Les barrettes de micropuits sont enfermées dans des sachets alu refermables. Conserver entre 2 et 8 ˚C.
5XCW	403583	Solution de lavage concentrée (5X) : soluté tampon de phosphate contenant du Tween 20 et du ProClin 300 0,05 %. Diluer à l'eau désionisée ou distillée avant usage. Conserver entre 2 et 8 ˚C.
VPC	403607	Peroxydase de raifort marquée à la streptavidine (200X) : peroxydase de raifort marquée à la streptavidine dans un stabilisant. Dilution obligatoire dans le diluant avant usage. Conserver entre 2 et 8 ˚C.
VPD	403589	Diluant : soluté tampon de phosphate contenant de l'albumine de sérum bovin et ProClin 300 0,05 %. Prêt à l'emploi. Conserver entre 2 et 8 ˚C.
VCAL	403582	Étalon : pool de plasma humain normal. Exclusivement à usage unique. Les valeurs assignées se trouvent dans le Analysis Software. Diluer dans le diluant avant usage. Conserver à ≤ -15 °C.
VDA	403615	Anticorps de détection du VWF (200X) : anticorps monoclonal murin biotinylé avec ProClin 300 0,05 %. Diluer dans le diluant avant usage. Conserver entre 2 et 8 ˚C.
PDA	403599	Anticorps de détection du propeptide (200X) : anticorps monoclonal murin biotinylé avec ProClin 300 0,05 %. Diluer dans le diluant avant usage. Conserver entre 2 et 8 ˚C.
QA	403608	Substrat A : dilution obligatoire de 9 volumes de substrat A pour 1 volume de substrat B avant usage. Conserver entre 2 et 8 ˚C.
QB	403610	Substrat B : dilution obligatoire de 9 volumes de substrat A pour 1 volume de substrat B avant usage. Conserver entre 2 et 8 ˚C.
QSS	403604	Solution d'arrêt : prête à l'emploi. Conserver entre 2 et 8 ˚C.
PS	503019	Scellants pour plaques.
AS	503009	VWF & Propeptide Analysis Software. Analysis Software sur CD.

PRÉCAUTIONS

- Ne pas utiliser les réactifs qui sont troubles ou contaminés.
- Ne pas utiliser les réactifs au-delà de leur date de péremption.
- Les micropuits et les réactifs inclus dans ce coffret ne doivent pas être utilisés conjointement avec d'autre trousse.
- Le remplacement des composants fournis dans cette trousse par d'autres risque de fausser les résultats.
- Jeter tout étalon dégelé et barrettes de micropuits utilisées après chaque dosage.
- Jeter tout étalon dilué inutilisé, les anticorps de détection dilués, la peroxydase de raifort marquée à la streptavidine diluée et la solution de substrat.
- Lors de dilutions, suivre les techniques de distribution et de rinçage préconisées par le fabricant de la pipette.
- Lors de dilutions, ne pas pipeter moins de 5 µl de réactif ou d'échantillon. L'utilisation de volumes inférieurs à 5 µl pour la dilution augmentera l'imprécision dilutionnelle.
- Des pipettes précisément étalonnées devront être utilisées pour l'ajout des réactifs.
- La réaction du substrat enzymatique est sensible à la température et doit avoir lieu à un endroit où la température ambiante est maintenue entre 22 et 25 ˚C.
- Les réactifs pourront contenir plus que le volume indiqué sur le récipient.

MISES EN GARDE

- Le plasma humain utilisé comme étalon pour ce produit a été testé et s'est avéré négatif pour les anticorps dirigés contre le VIH, le VHC et le HBsAg par des méthodes approuvées par la FDA. Toutefois, aucune méthode de test ne peut offrir l'assurance complète de l'absence du VIH, du virus de l'hépatite C, du virus de l'hépatite B ou d'autres agents infectieux. Par conséquent, ces matériels doivent être manipulés comme s'ils étaient potentiellement infectieux.
- Jeter tous les composants une fois la procédure terminée en suivant les réglementations locales.

ÉCHANTILLONS

Prélèvement et préparation des échantillons

REMARQUE : Seul du plasma pauvre en plaquettes prélevé dans du citrate de sodium pourra être utilisé pour ce dosage. Pour des détails, se reporter au document intitulé Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assay; Approved Guideline CLSI H21-A5, Volume 28, Number 5, December 2008.

Le prélèvement de plasma pauvre en plaquettes doit être effectué comme suit :

1. Prélever le sang dans des tubes de citrate de sodium tamponné (3,8 % ou 3,2 %).

REMARQUE : Les tubes de prélèvement partiel sont INTERDITS. Comme les tubes sont pré-étalonnés pour aspirer le volume spécifié de sang, l'échantillon résultant n'affichera pas le rapport sang:anticoagulant de 9:1 adéquat si un échantillon complet n'est pas prélevé.

2. Après prélèvement, stocker le tube à la verticale à température ambiante jusqu'à centrifugation.

REMARQUE : Pour les meilleurs résultats, les échantillons sanguins devront être centrifugés dans les 15 minutes qui suivent le prélèvement, mais pas au-delà de deux heures.

3. Re-mélanger le prélèvement sanguin juste après centrifugation par inversion douce du tube 8 à 10 fois.

4. Centrifuger le prélèvement sanguin à température ambiante dans un rotor horizontal pendant 15 à 20 minutes entre 1500 et 1800 FCR (force centrifuge relative).

   AVERTISSEMENT : Une vitesse centrifuge excessive (supérieure à 2000 FCR) risque de causer la casse des tubes, une exposition au sang et des blessures.

5. Après centrifugation, recueillir les 2/3 supérieurs de la couche de plasma en pipetant le plasma dans un tube en polypropylène propre.

6. Re-centrifuger le plasma collecté entre 1500 et 1800 FCR pendant 15 à 20 minutes pour éliminer les globules rouges ou plaquettes résiduels.

7. Transférer les 2/3 supérieurs de la couche de plasma dans un tube de polypropylène propre, en veillant à ne pas troubler les cellules au fond du tube.

Conservation des échantillons

1. Le plasma doit être conservé à température ambiante et dosé dans les 4 heures qui suivent OU divisé en aliquotes et congelé à -15 °C ou moins jusqu'à utilisation.

2. Le plasma ou l'étalon congelé devra être dégelé à 37 °C, puis incubé à 37 °C pendant 10 minutes de plus avant usage pour permettre la solubilisation adéquate des antigènes. Un bain-marie de 37 °C ou un incubateur sec à 37 °C pourra être utilisé. Le plasma décongelé devra être conservé à température ambiante et dosé dans les 4 heures qui suivent.

MODE OPÉRATOIRE

Matériel fourni

Il est possible que les tubes contiennent plus de réactif que ce qui est indiqué sur l'étiquette. Veiller à mesurer le réactif avec un dispositif approprié en effectuant les dilutions.

Boîte A (303296):
1. 6 x tubes d'étalon de 100 µl

Boîte B (303297):

1. 12 – 1 x 8 barrettes de micropuits noirs pour la détection de VWF (code-couleur jaune) avec son support
2. 12 – 1 x 8 barrettes de micropuits noirs pour la détection de propeptide (code-couleur vert) avec son support
3. 3 x 50 ml de diluant
4. 1 x 125 ml de solution de lavage concentrée (5X)
5. 1 x 40 µl d'anticorps de détection de VWF
6. 1 x 40 µl d'anticorps de détection de propeptide
7. 1 x 75 µl de peroxydase de raifort marquée à la streptavidine
8. 1 x 14 ml de substrat A
9. 1 x 2 ml de substrat B
10. 1 x 14 ml de solution d'arrêt
11. 12 scellants pour plaques
12. Analysis Software sur CD

Matériel supplémentaire nécessaire

1. Tubes à essai ou tubes de microtubes à centrifuger pour les dilutions d'échantillons patient et de contrôles et les dilutions de réactifs
2. Pipettes de transfert
3. Micropipettes réglables pour administrer 1 à 10 µl, 10 à 100 µl et 100 à 1,000 µl et embouts jetables
4. Chronomètre
5. Lecteur de plaque fluorescente capable de mesurer la fluorescence à une longueur d'excitation comprise entre 315 et 340 et une longueur d'émission comprise entre 370 et 470 nm
6. Eau désionisée ou distillée
7. Papier absorbant
8. Laveur de microplaque
9. Centrifugeuse
10. Bain-marie de 37 °C ou incubateur sec à 37 °C
11. Ordinateur avec Microsoft Excel version 2003 ou 2007

Procédure

1. Porter tous les réactifs de dosage de la boîte B à température ambiante (22 à 25 °C).

REMARQUE : Une fois tous les réactifs de la boîte B à température ambiante (22 à 25 °C), tous les réactifs peuvent être dilués et conservés à température ambiante pendant toute la durée du dosage. Aucun réactif n'est photosensible.

2. Déterminer le nombre d'échantillons patient à tester. À l'aide de la feuille d'annotations, assigner chaque échantillon à une position comprenant deux puits (dosage en double). Noter l'identité de chaque échantillon sur la feuille d'annotations.

3. Fabriquer la solution de lavage de travail en diluant la solution de lavage concentrée (5XCW). Ajouter 1 volume de solution de lavage concentrée à 4 volumes d'eau désionisée ou distillée. **Bien mélanger**. La solution de lavage de travail peut être conservée entre 2 et 8 °C pendant 2 semaines.

Barrettes	**4 – 1x8**	**12 – 1x8**	**24 – 1x8**
Solution de lavage concentrée	20 ml	60 ml	120 ml
Eau désionisée	80 ml	240 ml	480 ml

4. Retirer le nombre approprié de barrettes VWF et propeptide, comme identifié sur la feuille d'annotations. Refermer hermétiquement et rapidement les barrettes inutiles dans le sachet de protection.

REMARQUE : Deux cadres seulement sont fournis dans la trousse. Ne les jeter pas avant d'avoir utilisé toutes les barrettes.

5. Dégeler une aliquote de solution étalon mère de la boîte A, de même que tous les échantillons de plasma à doser gelés pour les porter à 37 °C.

6. Une fois dégelés, la solution étalon mère et les échantillons devront être incubés à 37 °C pendant 10 minutes supplémentaires pour permettre la solubilisation adéquate du VWF avant dilution.

REMARQUE : La solution étalon mère doit être dégelée et utilisée une seule fois par flacon. Ne pas recongeler.

7. Utiliser le tableau suivant pour créer les étalons A à E en ajoutant le volume de plasma spécifié au volume approprié de diluant (VPD). Cette dilution procure assez de produit pour doser les étalons et les contrôles en double sur les plaques VWF et Propeptide.

Niveau d'étalon	Volume de plasma	Volume de diluant
Étalon A	20 µl de solution étalon mère	1 080 µl de VPD
Étalon B	200 µl d'étalon A	80 µl de VPD
Étalon C	200 µl d'étalon A	260 µl de VPD
Étalon D	200 µl d'étalon A	1000 µl de VPD
Étalon E	----	300 µl de VPD

8. Utiliser le tableau suivant pour créer les contrôles positifs en ajoutant le volume de plasma spécifié au volume approprié de diluant (VPD). Cette dilution procure assez de produit pour doser l'échantillon en double sur les barrettes VWF et Propeptide.

Niveau de contrôle	Volume de plasma	Volume de diluant
Contrôle positif haut	5 µl de solution étalon mère	495 µl de VPD
Contrôle positif bas	5 µl de solution étalon mère	995 µl de VPD

9. Pour chaque échantillon patient à doser, créer une dilution conformément au tableau suivant. Une dilution 1:200 suffit pour la plupart des échantillons et permet un niveau inférieur de détection - 6 UI/dl ou 6 U/dl. Pour confirmer un échantillon à bas niveau ou déficient, une dilution de 1:20 est recommandée. L'utilisation d'une dilution 1:20 dilution permet un niveau inférieur de détection - <1 UI/dl ou <1 U/dl. Des dilutions comprises entre 1:300 et 1:20 sont appropriées pour ce dosage.

Dilution d'échantillon	Volume de plasma patient	Volume de diluant
1:200	5 µl	995 µl de VPD
1:20	13 µl	247 µl de VPD

10. Ajouter 50 µl d'étalon (A à E) (en double) aux micropuits assignés sur les barrettes VWF (jaune) et propeptide (verte).

11. Ajouter 50 µl de contrôle positif haut (en double) aux micropuits assignés aux barrettes VWF et propeptide.

12. Ajouter 50 µl de contrôle positif bas (en double) aux micropuits assignés aux barrettes VWF et propeptide.

13. Ajouter 50 µl de solution d'échantillon de plasma dilué préparé à l'étape 9 (en double) aux micropuits assignés sur les barrettes VWF et propeptide.

REMARQUE : Un jeu d'étalons et de contrôles est requis sur chaque type de barrette de micropuits utilisée à chaque fois qu'un dosage a lieu.

REMARQUE : Pour éviter les erreurs, étiqueter chaque barrette.

14. Fermer hermétiquement les micropuits avec un scellant pour plaques et incuber pendant 15 minutes dans un bain-marie ou un incubateur à 37 ˚C.

REMARQUE : Comme le temps d'incubation est de 15 minutes seulement, il est important d'ajouter tous les échantillons aux barrettes le plus vite possible, en commençant par le même puits à chaque fois. Tous les ajouts d'échantillon doivent être effectués dans les 5 minutes.

15. Diluer l'anticorps de détection de VWF (VDA) dans le diluant (VPD), comme indiqué dans le tableau suivant. Le VDA sera ajouté dans tous les micropuits VWF.

Barrettes	2 – 1x8	4 - 1x8	12 - 1x8
VDA	6 µl	10 µl	30 µl
VPD	1,2 ml	2 ml	6 ml

16. Diluer l'anticorps de détection de propeptide (PDA) dans le diluant (VPD), comme indiqué dans le tableau suivant. Le PDA sera ajouté dans tous les micropuits propeptide.

Barrettes	2 – 1x8	4 - 1x8	12 - 1x8
PDA	6 µl	10 µl	30 µl
VPD	1,2 ml	2 ml	6 ml

17. ÉTAPE DE LAVAGE

    a) Aspirer ou décanter le contenu de chaque puits et absorber avec du papier absorbant.
    b) Ajouter 300 µl de solution de lavage de travail.
    c) Aspirer ou décanter.
    d) Reprendre les étapes b + c pour 3 lavages au total.
    e) Décanter vigoureusement pour éliminer toute la solution de lavage résiduelle. Retourner sur du papier absorbant pour éviter le dessèchement.

REMARQUE : Il est important de retirer complètement toute la solution de lavage après le lavage final.

18. Ajouter 50 µl d'anticorps de détection de VWF (VDA) dans chaque puits de la plaque VWF (code-couleur jaune).

19. Ajouter 50 µl d'anticorps de détection de propeptide (PDA) dans chaque puits de la plaque Propeptide (code-couleur vert).

20. Fermer hermétiquement les micropuits avec un scellant pour plaques et incuber pendant 15 minutes dans un bain-marie ou un incubateur à 37 °C.

21. Diluer la peroxydase de raifort marquée à la streptavidine (VPC) dans le diluant (VPD), comme indiqué dans le tableau suivant. Utiliser un récipient en polypropylène. La peroxydase de raifort marquée à la streptavidine diluée sera ajoutée dans tous les puits utilisés, sur les deux types de barrettes de micropuits.

Barrettes	**4 - 1x8**	**8 - 1x8**	**24 - 1x8**
VPC	10 µl	20 µl	60 µl
VPD	2 ml	4 ml	12 ml

22. ÉTAPE DE LAVAGE

    a) Aspirer ou décanter le contenu de chaque puits et absorber avec du papier absorbant.
    b) Ajouter 300 µl de solution de lavage de travail.
    c) Aspirer ou décanter.
    d) Reprendre les étapes b + c pour 3 lavages au total.
    e) Décanter vigoureusement pour éliminer toute la solution de lavage résiduelle. Retourner sur du papier absorbant pour éviter le dessèchement.

23 Ajouter 50 µl de peroxydase de raifort marquée à la streptavidine diluée dans tous les micropuits Propeptide.

24. Fermer hermétiquement les micropuits avec un scellant pour plaques et incuber pendant 15 minutes dans un bain-marie ou un incubateur à 37 °C.

25. Préparer une solution de substrat en ajoutant 9 volumes de substrat A (QA) à 1 volume de substrat B (QB). Utiliser un récipient en polypropylène. Bien mélanger. Ce produit n'est pas photosensible. Ce produit sera ajouté dans tous les puits utilisés, sur les deux types de barrettes de micropuits.

Barrettes	**4 - 1x8**	**8 - 1x8**	**24 - 1x8**
Solution de substrat A (QA)	1,8 ml	3,6 ml	10,8 ml
Solution de substrat B (QB)	200 µl	400 µl	1,2 ml

26. ÉTAPE DE LAVAGE

    a) Aspirer ou décanter le contenu de chaque puits et absorber avec du papier absorbant.
    b) Ajouter 300 µl de solution de lavage de travail.
    c) Aspirer ou décanter.
    d) Reprendre les étapes b + c pour 3 lavages au total.
    e) Décanter vigoureusement pour éliminer toute la solution de lavage résiduelle. Retourner sur du papier absorbant pour éviter le dessèchement.

REMARQUE : Il est important de retirer complètement toute la solution de lavage après le lavage final.

27. Ajouter 50 µl de solution de substrat mélangée à l'étape 25 dans chaque puits utilisé sur les deux types de barrettes de micropuits.

28. Fermer hermétiquement les micropuits avec un scellant pour plaques et incuber pendant 15 minutes à TEMPÉRATURE AMBIANTE (22 à 25 °C). Il est inutile d'abriter la réaction de la lumière.

29. Arrêter la réaction en ajoutant 50 µl de solution d'arrêt (QSS) dans chaque puits, dans le même ordre que pour l'addition du substrat. La plaque devra être lue dans un lecteur de plaque fluorescente dans les 60 minutes qui suivent l'ajout de solution d'arrêt.

30. Lire la plaque dans un lecteur de plaque fluorescente, avec longueurs d'onde d'excitation entre 315 et 340 nm et longueurs d'onde d'émission entre 370 et 470 nm, à température ambiante (22 à 25 °C).

DÉTAILS D'ÉTALONNAGE

La solution étalon mère fournie dans le dosage VWF & Propeptide Assay est du plasma humain normal congelé en pool. Le pool est constitué de 35 donneurs masculins et féminins différents en bonne santé, non fumeurs et non médicamentés dont l'âge est compris entre 18 et 36 ans. La solution étalon mère est affectée d'une valeur VWF et propeptide par dosage selon SSC/ISTH Secondary Coagulation Standard Lot #3. Le SSC/ISTH Secondary Coagulation Standard Lot #3 a été affecté d'un niveau d'antigène VWF de 106 UI/dl. Le SSC/ISTH Secondary Coagulation Standard Lot #3 n'a pas été affecté d'un niveau de propeptide. Comme il n'existe aucune norme reconnue sur le plan international pour la mesure des propeptides et comme il a été prouvé que le rapport propeptide:VWF moyen chez les donneurs normaux est proche de $1,0^{7}$, GTI Diagnostics a affecté en interne le SSC/ISTH Secondary Coagulation Standard Lot #3 d'un niveau de propeptide de 106 U/dl, égal à son niveau VWF. Les valeurs de VWF et propeptide affectées à la solution étalon mère sont spécifiques des lots et apparaissent dans l' Analysis Software fourni.

CONTRÔLE QUALITÉ

Tous les étalons, les contrôles et les échantillons sont dosés en double. Les unités de fluorescence relative (RFU) de chaque puits doivent être similaires. Le % de différence entre les réplicats des étalons A à D, des contrôles et des échantillons doit être $\leq$ 20%.

Le dosage VWF & Propeptide Assay utilise deux contrôles positifs (contrôle positif haut et contrôle positif bas). Le contrôle positif haut est dilué de manière à ce que les unités de fluorescence relative se situent dans le milieu de la région haute de la courbe d'étalonnage. Le contrôle positif bas est dilué de manière à ce que les unités de fluorescence relative se situent dans le milieu de la région basse de la courbe d'étalonnage. L' Analysis Software calcule les résultats communicables définitifs pour les contrôles en multipliant les niveaux d'antigène obtenus à partir de la courbe d'étalonnage par la dilution d'échantillon utilisée. Comme les deux contrôles sont des dilutions du même matériel, les résultats communicables définitifs obtenus devront être similaires et les valeurs pour les deux contrôles doivent se situer dans les intervalles de contrôle acceptables indiqués dans l' Analysis Software. Si les valeurs de contrôle se situent en dehors des intervalles acceptables, le dosage devra être répété. Si les valeurs de contrôle se situent en dehors de l'intervalle acceptable pour un antigène (par ex. VWF), mais sont acceptables pour le second antigène (par ex. Propeptide), seule la détermination d'antigène correspondant au contrôle ayant échoué devra être recommencée.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS DU TEST

Construire une courbe d'étalonnage en traçant la valeur de fluorescence moyenne (n=2) pour chaque courbe d'étalonnage par rapport à sa valeur assignée de VWF ou propeptide à l'aide d' Analysis Software figurant sur le CD fourni. Les valeurs assignées spécifiques des lots pour VWF et propeptide se trouvent dans l' Analysis Software fourni. Une courbe d'étalonnage pour chaque type de plaque doit être produite à chaque dosage. Les instructions d'utilisation détaillées du manuel Analysis Software se trouvent à la première page du manuel. Le manuel Analysis Software calcule les valeurs de fluorescence moyenne issues des puits en double pour tous les niveaux d'étalon, les contrôles et les échantillons dosés. Déterminer la concentration de VWF et de propeptide dans les contrôles et les échantillons de plasma patient à l'aide du manuel Analysis Software. Le manuel Analysis Software trace un graphe des données et résout l'équation de meilleur ajustement pour obtenir les UI/dl de VWF ou les U/dl de propeptide pour les contrôles et les échantillons de plasma patient. Le manuel Analysis Software calcule également un rapport propeptide:VWF pour chaque échantillon dosé.

Si les échantillons de plasma donnent des valeurs de fluorescence relative supérieures à celles obtenues pour l'étalon de plus haut niveau, le résultat communicable sera «ORR » (Les valeurs moyennes de fluorescence dépassent la valeur moyenne du calibrant le plus élevé) et l'échantillon devra être testé à une dilution supérieure pour obtenir un résultat dans l'intervalle d'étalonnage. Si un échantillon est dosé à une dilution 1:200, la limite inférieure de l'intervalle de dosage est de 6 UI/dl ou 6 U/dl. Si le résultat pour un échantillon de plasma est inférieur à 6 UI/dl de VWF ou 6 U/dl de propeptides, l'échantillon doivent être dosé à une dilution de 1:20. Avec une dilution 1:20, la limite inférieure de l'intervalle de dosage est de <1 UI/dl ou <1 U/dl. Des dilutions d'échantillon comprises entre 1:300 et 1:20 sont appropriées pour ce dosage.

LIMITES DE LA TECHNIQUE

- Comme le dosage VWF & Propeptide Assay utilise des anticorps monoclonaux de souris pour la capture et la détection des antigènes, la présence d'anticorps humains anti-souris dans un échantillon pourra fausser les résultats. De manière similaire, la présence de facteur rhumatoïde dans un échantillon risque de fausser les résultats du dosage.
- Les résultats de ce dosage ne doivent pas servir de seule base à une décision clinique.

VALEURS ATTENDUES

L'intervalle normal pour le VWF antigène varie en fonction du groupe sanguin - le plasma de patients de groupe sanguin O présentant des niveaux réduits par rapport aux autres types de groupe sanguin. L'intervalle normal publié pour le VWF antigène est de 50 à 150 U/dl chez les patients de groupe sanguin O et de 90 à 200 U/dl chez les autres groupes sanguins.[4] Chaque laboratoire devra déterminer ses propres intervalles normaux spécifiques des groupes sanguins pour le VWF antigène.

L'intervalle normal du propeptide n'est pas affecté par le groupe sanguin du donneur. L'intervalle normal publié pour le propeptide est de 55 à 219 U/dl pour tous les groupes sanguins.[7] Chaque laboratoire devra déterminer son propre intervalle normal pour le propeptide.

SEUIL DE COUPURE CLINIQUE

Les échantillons issus des populations suivantes ont été évalués à l'aide du dosage VWF & Propeptide Assay dans le cadre de deux études cliniques : 115 patients VWD de type 1 diagnostiqués sur la base du taux de VWF antigène, de l'activité du cofacteur de la ristocétine et des antécédents hémorragiques ont été testés et 23 patients VWD de type 1 avec une clairance augmentée du VWF (Type 1c) diagnostiqués sur la base du taux de VWF antigène, de l'activité du cofacteur de la ristocétine, des antécédents hémorragiques et de la présence d'une mutation ponctuelle ayant précédemment montré une augmentation de la clairance de VWF.

L'analyse de la courbe ROC (Receiver operator characteristics) a permis de déterminer le seuil de coupure diagnostique pour la clairance augmentée de VWF en fonction des valeurs pour le rapport Propeptide:VWF. À partir de l'analyse ROC, un seuil de coupure de PP:VWF > 3,0 a été sélectionné pour fournir une sensibilité et une spécificité cliniques optimums pour faire la distinction entre la VWD de type 1 et la VWD de type 1 avec clairrance de VWF augmentée (Type 1c). L'utilisation d'un rapport > 3,0 a donné une sensibilité de 100 %, caractérisant correctement tous les patients de type 1c, et une spécificité de 95,7 %, où 5 patients de type 1 ont été caractérisés comme étant de type 1c. Trois des 5 patients mal caractérisés étaient de groupe sanguin O et un de groupe sanguin A ; quant au cinquième, son groupe sanguin était inconnu. Comme il a été démontré que les patients de groupe sanguin O présentent généralement un taux de VWF inférieur et un rapport propeptide:VWF supérieur, nous suggérons l'utilisation de la zone floue suivante. Les rapports propeptide:VWF de 3,0 à 4,1 pourront être dus à une clairance augmentée du VWF ou résulter d'un patient VWD de type 1 et de groupe sanguin O. Les rapports > 4,1 indiquent une VWD de type 1c, quel que soit le groupe sanguin.

PERFORMANCES SPÉCIFIQUES

Pour garantir une réactivité et une spécificité adaptées, chaque lot de dosage VWF & Propeptide Assay est testé avant commercialisation avec des échantillons contenant des taux normaux et réduits de VWF et de propeptide.

Précision

L'imprécision intra-dosage, inter-dosages et totale du dosage VWF & Propeptide Assay a été déterminée. Cinq échantillons avec différents niveaux de VWF et de propeptide ont été testés dans le dosage VWF & Propeptide Assay en double avec 20 dosages séparés. Pour obtenir l'imprécision des résultats communicables, les données ont été analysées par ANOVA selon le document EP5-A2 du CLSI intitulé, Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guidelines. Ces résultats apparaissent dans le tableau ci-dessous. Pour la mesure du VWF antigène, le CV (%) total pour tous les échantillons était < 11,5 %. Un échantillon déficient en VWF a également été testé et déterminé comme ayant < 1 UI/dl de VWF dans les 20 séries de dosage. Pour la mesure des propeptides, le CV (%) total pour les échantillons 1 à 3 était < 6 %. L'échantillon 4 a affiché un CV (%) total de 25 %, mais les valeurs ont uniquement oscillé entre 1 et 6 U/dl de propeptide sur les 20 séries de dosage. Un échantillon déficient en propeptide a également été testé et déterminé comme ayant < 1 U/dl de propeptide dans les 20 séries de dosage.

Échantillon	UI/dl de VWF en moyenne	Écart-type intra-dosage	CV (%) intra-dosage	Écart-type inter-dosages	CV (%) inter-dosages	Écart-type total	CV (%) total
Échantillon 1 Normal	93	3,4	3,7	5,5	5,9	6,1	6,6
Échantillon 2 Normal	114	3,0	2,6	12,8	11,2	13,0	11,4
Échantillon 3 Moyen	53	2,0	3,8	4,1	7,7	4,4	8,3
Échantillon 4 Bas	18	0,9	5,0	1,4	7,8	1,6	8,9

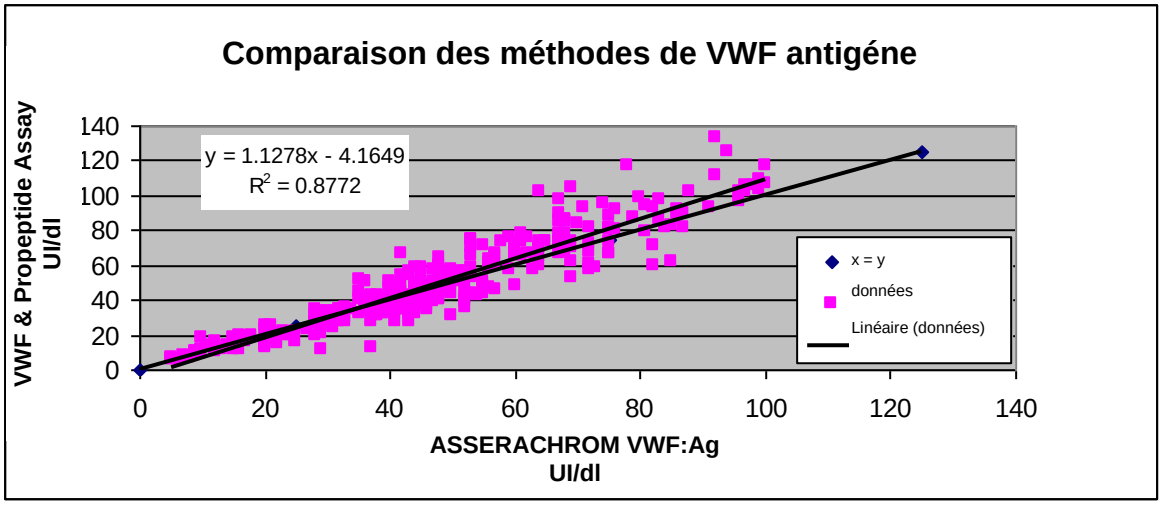
Échantillon	U/dL de propeptide en moyenne	Écart-type intra-dosage	CV (%) intra-dosage	Écart-type inter-dosages	CV (%) inter-dosages	Écart-type total	CV (%) total
Échantillon 1 Normal	89	2,7	3,0	4,8	5,4	5,1	5,7
Échantillon 2 Normal	105	1,8	1,7	4,7	4,5	4,9	4,7
Échantillon 3 Moyen	52	1,8	3,5	2,5	4,8	2,8	5,4
Échantillon 4 Bas	4	0,4	10,0	1,0	25,0	1,0	25,0

Limite de détection et intervalle de dosage

La limite de détection est de 0,021 UI/dl pour le VWF et de 0,021 U/dl pour les propeptides et elle est confirmée sur chaque lot de trousses. Si un échantillon est dosé à une dilution 1:200, la limite inférieure de l'intervalle de dosage est de 4 UI/dl (VWF) ou 4 de U/dl (propeptide). Il est suggéré que pour tout échantillon avec des valeurs d'antigène < 6 UI/dl de VWF ou < 6 U/dl de propeptide, le dosage soit répété en utilisant une dilution d'échantillon de 1:20. Lorsqu'un échantillon est dosé à une dilution de 1:20, la limite inférieure de l'intervalle de dosage est de 0,42 UI/dl (VWF) ou de 0,42 U/dl (propeptide), mais le manuel Analysis Software signalera ces résultats sous la forme <1 UI/dl (VWF) ou <1 U/dl (propeptide). Il n'y a aucun sens clinique à signaler des valeurs d'antigène < 1 UI/dl (VWF) ou <1 U/dl (propeptide). La limite supérieure de l'intervalle de dosage dépend du lot spécifique de la solution étalon mère utilisée dans le dosage, mais est au moins de 273 UI/dl (VWF) ou de 273 U/dl (propeptide).

Comparaison des méthodes : comparaison du dosage VWF & Propeptide Assay au dosage ASSERACHROM VWF:Ag de Diagnostica Stago

Trois études séparées ont été effectuées : dans ces études, les valeurs d'antigène obtenues à l'aide du dosage VWF & Propeptide Assay ont été comparées à celles d'un dosage ayant déjà obtenu son autorisation de mise sur le marché de la FDA - le dosage ASSERACHROM VWF:Ag de Diagnostica Stago. En combinant les résultats des trois études, 298 échantillons de plasma ont été dosés. Le graphe suivant montre les résultats de l'analyse de régression linéaire pour le VWF où la pente de la courbe était de 1,13 avec un intervalle de confiance à 95 % de 1,08 à 1,18 et le point d'intersection était de -4,16 avec un intervalle de confiance à 95 % de -6,72 à -1,61.



Substances Interférente

Les substances suivantes n'ont montré aucune interférence avec le dosage VWF & Propeptide Assayaux concentrations indiquées :

Hémoglobine	≤ 500 mg/dl
Bilirubine	≤ 20 mg/dl
Intralipide	≤ 500 mg/dl

RÉFÉRENCES

1. Sadler JE, Blinder M. “von Willebrand disease: Diagnosis, classification, and treatment. In: Colman, et al. (eds)”. *Hemostasis and Thrombosis* 2000; 825- 837.
2. Montgomery RR. “Structure and function of von Willebrand factor. In: Colman, et al. (eds)”. *Hemostasis and Thrombosis* 2000; 825- 837.
3. Federici AB, Rand JH, Bucciarelli P, Budde U, van Genderen PJ, Mohori H, Meyer D. Rodighiero F, Sadler JE. “Subcommittee on von Willebrand Factor. Acquired von Willebrand syndrome: data from an international registry”. *Thromb Haemost* 2000; **84**: 345-349.
4. “Assays of von Willebrand Factor Antigen and Ristocetin Cofactor Acrivity; Approved Guideline” *CLSI Guideline H51-A* 2002, Vol. 22, No. 20.
5. Fay PJ, Kawai Y, Wagner DD, Ginsburg D, Bontron D, Ohlsson-Wilhelm BM, Chavin SI, Abraham GN, Handin RI, Orkin SH, Montgomery RR, Marder VJ. “Propolypeptide of von Willebrand factor circulates in blood and is identical to von Willebrand antigen II”. *Science*1986*;* **232:**995.
6. Wagner DD, Fay PJ, Sporn LA, Sinha S, Lawrence SO, Marder VJ. “Divergent fates of von Willebrand factor and its propolypeptide (von Willebrand antigen II) after secretion from endothelial cells”. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84:**1955.
7. Haberichter SL, Balistreri M, Christopherson P, Morateck P, Gavazova S, Bellissimo DB, Manco-Johnson MJ, Cox-Gill J, Motgomery, RR. “Assay of the von Willebrand factor (VWF) propeptide to identify patients with type 1 von Willebrand disease with decreased VWF survival“. *Blood* 2206; **108:**3344-3351.
8. Schooten CJ, Tjernberg P, Westein E, et al. “Cysteine-mutations in von Willebrand factor associated with increased clearance”. *J Thromb Haemost* 2005; **3:**2228-2237.
9. Casonato A, Pontara E, Sartorello F, et al. “Reduced von Willebrand factor survival in type Vicenza con Willebrand disease”. *Blood* 2002; **99:**180-184.
10. Sztukowska M, Gallinaro L,Cattini MG,Pontara E,Sartorello F, Daidone V, Padrini R, Pagnan A, Casonato A. “Von Willebrand factor propeptide makes it easy to identify the shorter Von Willebrand factor survival in patients with type 1 and type Vicenza von Willebrand disease”. *British Journal of Haematology* 2008; **143:**107-114.
11. van Genderen PJ, Boertjes RC, van Mourik JA. „Quantitative analysis of von Willebrand factor and its propeptide in plasma in acquired von Willebrand syndrome”. *Thromb Haemost* 1998; **80:**495-498.
12. Scott JP, Vokac E, Foster PA, Kassay K, Montgomery RR. “The von Willebrand factor propolypeptide (vW AgII) as a marker of acquired von Willebrand syndrome”. *Blood* 1993; **82:**150a.
13. van Mourik JA, Boertjes R, Huisveld IA et al. “von Willebrand factor propeptide in vascular disorders: A tool to distinguish between acute and chronic endothelial cell perturbation”. *Blood* 1999; **94:**179-185.

Immucor GTI Diagnostics, Inc.
20925 Crossroads Circle
Waukesha, WI 53186 USA

EC REP
Immucor Medizinische Diagnostik GmbH
Adam-Opel-Strasse 26A
Rodermark 63322
Germany

US and International Contact Information:
Technical Support : waukeshatechsupport@immucor.com

www.immucor.com

©2007-2015 Immucor GTI Diagnostics, Inc.

303292.IFUFR Rev C
2015-05-29

Warning	Attention
H317	Peut provoquer une allergie cutanée
P261	Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols
P272	Les vêtements de travail contaminés ne devraient pas sortir du lieu de travail
P280	Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage
P302 + P352	EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: Laver abondamment à l’eau et au savon
P333 + P313	En cas d'irritation ou d'éruption cutanée: consulter un médecin
P501	Éliminer le contenu/récipient dans une installation d'élimination des déchets agréée